SHIMADZU BIOTECH

241-08908A

研究用試薬

G1

Ampdirect® Technology

ノロウイルスG1検出試薬キット

Direct RT-PCR Kit for Norovirus G1 RNA Detection

保存温度：–20℃　使用回数：48 テスト
有効期限：6 ヵ月　製品番号：P/N:241-08905-91

取扱説明書

製品に関する注意

- 本試薬キットは研究用試薬です。臨床診断の目的では使用しないでください。
- 人、動物の診断・治療用として承認されていません。医薬品、化粧品、食品など他の用途で人、動物の身体に直接使用しないでください。
- 本試薬キットはノロウイルス G1（Genogroup Ⅰ）遺伝子検出を目的とした試薬です。ノロウイルス G2（Genogroup Ⅱ）遺伝子検出を行う場合には別途、弊社製品「ノロウイルス G2 検出試薬キット（P/N：241-08905-92）」を使用してください。
- 本試薬キットに含まれる RT 用酵素には Invitrogen 製『M-MLV Reverse Transcriptase』、PCR 用酵素には EMD Biosciences 製『Nova*Taq*™ Hot Start DNA Polymerase』を採用しています。
- 本試薬キットによるノロウイルス G1 RNA の検出限界はおよそ 50 copies/reaction です。

技術的な内容に関するお問合せ窓口

株式会社島津製作所　分析計測事業部ライフサイエンス研究所
http://www.shimadzu-biotech.jp　TEL：075-823-1351　FAX：075-823-1364

特長

- 1 本のチューブで検体処理から RT-PCR までのトータルな操作ができます。
- 糞便検体に処理試薬を加えて加熱するだけで直接、Reverse Transcription（RT）-PCR ができます。
- 本試薬キットには偽陰性対策として内部コントロール DNA（I.C.）が含まれています。

使いかた

使用上の注意

- 本試薬キット付属の酵素は使用時以外できるだけ冷凍（-20℃）保存してください。それ以外の各試薬は室温にて解凍後、転倒混和または vortex 等でしっかり混和してスピンダウン後、使用時までできるだけ氷冷下で保存してください。またすべての試薬は使用後、すみやかに冷凍（-20℃）保存してください。
- 操作中にチューブ内で液が飛び散った場合は、スピンダウンしてから使用してください。

1 試薬（5 本）を確認する

No.	試薬名称	キャップ	容量
①	検体処理試薬　[G1]	透明	1 mL　× 1 tube
②	RT 用試薬　[G1]	緑	1.25 mL × 1 tube
③	RT 用酵素　[G1]	紫	12.5 μL × 1 tube
④	PCR 用試薬　[G1]	緑チップ、ループ付	240 μL　× 1 tube
⑤	PCR 用酵素　[G1]	紫チップ、ループ付	12.5 μL × 1 tube

2 検出方法に合わせて、必要品を準備する

※本試薬キット以外に次のものをご準備ください。

Ⅰ 電気泳動検出

電気泳動により特異的増幅産物のバンド長を検出します。

	品目	数量
Ⅰ用	1）PCR 装置	1 台
Ⅰ用	2）電気泳動槽、アガロースゲル※および分子量マーカ	
一般用	3）反応チューブ（PCR 装置に合ったチューブ）	1 本 /1 検体
一般用	4）RT 反応液調製用チューブ（0.5 mL または 1.5 mL）	1 本
一般用	5）PCR 反応液調製用チューブ（0.5 mL または 1.5 mL）	1 本
一般用	6）小型微量遠心機	1 台
一般用	7）恒温装置（サーマルサイクラーでの代用も可）	1 台
一般用	8）氷（クラッシュアイス）または冷却用アルミブロック	
一般用	9）マイクロピペット	
一般用	10）フィルター付チップ	

※：特異産物が 86 bp と低分子なため、短い DNA フラグメントの分離に適したアガロースゲル（TaKaRa 製『NuSieve® 3:1 Agarose』（ゲル濃度：4%）など）のご使用をお勧めします。

Ⅱ 融解温度検出

SYBR® Green Ⅰ（励起波長：490 nm、蛍光波長：530 nm）を用いて融解温度を検出します。

PCR 後の反応チューブのふたを開けずに検出できるので、コンタミネーションの危険性を低減できます。

	品目	数量
Ⅱ用	1）リアルタイム PCR 装置	1 台
Ⅱ用	2）125 × SYBR® Green Ⅰ溶液※1, ※2	
Ⅱ用	3）15 ～ 25 μM ROX レファレンス色素※3, ※4	
一般用	4）反応チューブ（PCR 装置に合ったチューブ）	1 本 /1 検体
一般用	5）RT 反応液調製用チューブ（0.5 mL または 1.5 mL）	1 本
一般用	6）PCR 反応液調製用チューブ（0.5 mL または 1.5 mL）	1 本
一般用	7）小型微量遠心機	1 台
一般用	8）恒温装置（サーマルサイクラーでの代用も可）	1 台
一般用	9）氷（クラッシュアイス）または冷却用アルミブロック	
一般用	10）マイクロピペット	
一般用	11）フィルター付チップ	

※ 1：SYBR® Green Ⅰに関しては、Molecular Probes 社が特許を保有しています。SYBR® Green Ⅰは正当権利者より購入してください。

※ 2：弊社では、Invitrogen 製『SYBR® Green Ⅰ nucleic acid gel stain』（10,000 ×）を TE にて 80 倍希釈（125 ×）した溶液を使用しています。

※ 3：Applied Biosystems 製のリアルタイム PCR 装置など、ROX の必要な装置を使用の場合のみ用意してください。

※ 4：弊社では Invitrogen 製『ROX Reference Dye』を使用しています。

3 前処理する

1. 糞便検体を生理食塩水または水に 5 ～ 10%（W/V）濃度で懸濁します。（0.1 mL ～ 1 mL 程度 /1 検体）
2. 糞便懸濁液を小型微量遠心機で 5 分程度遠心します。
3. 反応チューブに①検体処理試薬［G1］：19 μL と糞便遠心上清：1 μL を添加し、ピペッティングまたはタッピングでしっかり混合します。
4. 恒温装置で 85℃、1 分の熱処理を行います。（Final 20 μL/tube）
5. 氷冷します。

4 RT 反応液を調製し、RT 反応を行う

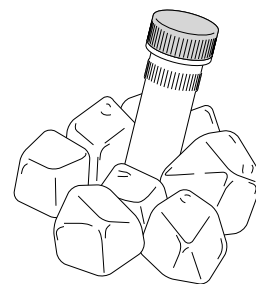
1 RT 反応液調製用チューブで RT 反応液を調製します。
（必要量の 1 割増程度で調製することをお勧めします。）

RT 反応液（1 反応分）

② RT 用試薬［G1］：	24.75 μL
③ RT 用酵素［G1］：	0.25 μL
Total：	25 μL

2 前処理したサンプル：20 μL に、RT 反応液：25 μL を添加します。
ピペッティングなどでしっかり混合し、恒温装置で RT 反応を行います。（Final 45 μL/tube）

RT 反応温度条件

37℃、30 分 → 95℃、5 分 → 氷冷

反応液の調製はできるだけ氷冷下で行ってください。

5 PCR で増幅し、検出する

⚠ 融解温度解析を行った後の PCR 産物を電気泳動すると、反応液中に含まれる SYBR® Green Ⅰの影響で泳動が遅くなり、産物サイズが実際より長く検出されます。

Ⅰ 電気泳動検出

1 PCR 反応液調製用チューブで PCR 反応液を調製します。
（必要量の 1 割増程度で調製することをお勧めします。）

PCR 反応液（1 反応分）

④ PCR 用試薬［G1］：	4.75 μL
⑤ PCR 用酵素［G1］：	0.25 μL
Total：	5 μL

2 RT 反応後のチューブ：45 μL に、PCR 反応液：5 μL を添加し、PCR を行います。（Final 50 μL/tube）

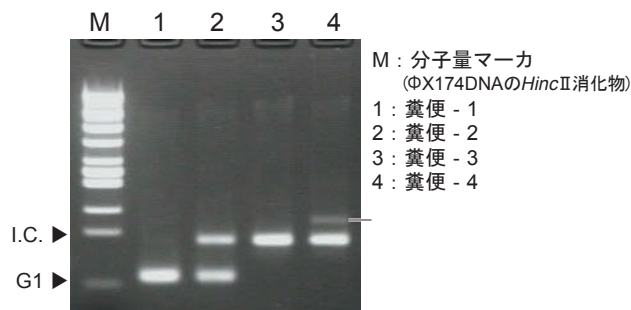
PCR 温度条件

95℃、10 分 → [95℃、30 秒 / 56℃、30 秒 / 72℃、60 秒] 45 サイクル → 72℃、7 分

3 電気泳動にて PCR 産物を確認し、判定します。

G1 ＼ I.C.		特異的増幅産物長：142 bp ○	特異的増幅産物長：142 bp ×
特異的増幅産物長：86 bp	○	陽性	陽性
特異的増幅産物長：86 bp	×	陰性	判定不能※

※バンドが確認できない場合は、再実験を行います。RT-PCR 阻害が疑われる場合は、糞便上清を生理食塩水または水で 10 倍希釈して同様の反応・検出を行ってください。

【検出例】

※ I.C. の増幅産物として、このように 142 bp より大きいサイズのもの（上側のバンド）が生じる場合がありますが、異常ではありません。

アガロースゲル：	TAE にて 4% 濃度にした TaKaRa 製『Nusieve® 3:1 Agarose』ゲル
ゲルへの産物添加量：	10 μL/ コーム
泳動条件：	100 V、30 分

判定結果

糞便 -1: ノロウイルス G1 陽性　　糞便 -3: ノロウイルス G1 陰性
糞便 -2: ノロウイルス G1 陽性　　糞便 -4: ノロウイルス G1 陰性

Ⅱ 融解温度検出

1 PCR 反応液調製用チューブで PCR 反応液を調製します。
（必要量の 1 割増程度で調製することをお勧めします。）

PCR 反応液（1 反応分）

④ PCR 用試薬［G1］：	4.75 μL
⑤ PCR 用酵素［G1］：	0.25 μL
125 × SYBR® Green Ⅰ溶液：	1 μL
15 ～ 25 μM ROX レファレンス色素：	1 μL （必要な場合のみ）
Total：	6 μL（ROX なし）、7 μL（ROX あり）

2 RT 反応後のチューブ:45 μL に、PCR 反応液:6 μL（ROX なし）または 7 μL（ROX あり）を添加し、PCR を行います。
（Final　ROX なし：51 μL/tube、ROX あり：52 μL/tube）

PCR 温度条件

95℃、10 分 → [95℃、30 秒 / 56℃、30 秒 / 72℃、60 秒] 45 サイクル → 72℃、7 分

3 融解温度解析を行い、判定します。

弊社では、Bio-Rad 製 iCycler iQ リアルタイム PCR 装置を使用し、65℃から 95℃まで（0.5℃ /10 秒刻み）の融解温度解析データを取得しています。それ以外の装置を使用した場合には、弊社の結果と若干異なる場合がありますのでご了承ください。

G1 ＼ I.C.		ピーク検出温度：87℃± 1℃ ○	ピーク検出温度：87℃± 1℃ ×
ピーク検出温度：83℃± 1℃	○	陽性	陽性
ピーク検出温度：83℃± 1℃	×	陰性	判定不能※

※ピークが確認できない場合は、再実験を行います。RT-PCR 阻害が疑われる場合は、糞便上清を生理食塩水または水で 10 倍希釈して同様の反応・検出を行ってください。

【検出例】

G1 のピーク▼　▼ I.C. のピーク

糞便 - 1
糞便 - 2
糞便 - 3
糞便 - 4

－⊿(蛍光強度)/⊿(温度)

65　70　75　80　85　90　95

温度(℃)

判定結果

糞便 -1: ノロウイルス G1 陽性　　糞便 -3: ノロウイルス G1 陰性
糞便 -2: ノロウイルス G1 陽性　　糞便 -4: ノロウイルス G1 陰性